

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"

DOTTORATO DI RICERCA IN NEUROSCIENZE

XVII CICLO

TESI DI DOTTORATO

TEST FUNZIONALI E STUDIO DI PROGRESSIONE

NELL'ATROFIA MULTISISTEMICA

COORDINATORE:

Chiar.mo Prof. Lucio Annunziato

CANDIDATO:

Dr.ssa Maria Teresa Pellecchia

TUTORE:

Prof. Paolo Barone

Anno Accademico 2004/2005

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	3
2. SVILUPPO DI UN NUOVO TEST DIAGNOSTICO PER L'ATROFIA MULTISISTEMICA: IL TEST ALL'ARGININA	8
3. VALIDAZIONE DEL TEST ALL'ARGININA NELLA DIAGNOSI DELL'ATROFIA MULTISISTEMICA	13
4. STUDIO DELLA RMN CON DIFFUSIONE PER LA QUANTIFICAZIONE DEL DANNO TISSUTALE NELL'ATROFIA MULTISISTEMICA DI TIPO PARKINSONIANO E DI TIPO CEREBELLARE.....	17
5. STUDIO PROSPETTICO DELLA STORIA NATURALE DELL'ATROFIA MULTISISTEMICA: PROGRESSIONE DELLA MALATTIA IN UN ANNO.....	30
6. BIBLIOGRAFIA	40

1. INTRODUZIONE

L'atrofia multisistemica (MSA) è una malattia neurodegenerativa sporadica caratterizzata clinicamente dalla variabile combinazione di parkinsonismo, segni disautonomici, cerebellari o piramidali e anatomopatologicamente da perdita cellulare, gliosi e inclusioni citoplasmatiche gliali in numerose strutture del sistema nervoso centrale, putamen, substantia nigra, nucleo motore dorsale del vago, locus coeruleus, neuroni catecolaminergici bulbari, ponte, cervelletto, nucleo di Onuf. Grazie alle recenti scoperte sulla patogenesi molecolare l'MSA è stata classificata come un'alfasinucleinopatia, insieme ad altre malattie neurodegenerative come la malattia di Parkinson e la demenza a corpi di Lewy (1).

L'incidenza della patologia è di 0,6 casi per 100000 abitanti per anno e, se si considera la popolazione di età >50 anni l'incidenza sale a 3 casi per 100000 per anno (2). La prevalenza varia da 1,9 a 4,9 casi per 100000 persone (3,4). Nella patogenesi della malattia è possibile giocare un ruolo fattori ambientali, ma finora nessuno studio ha dimostrato una chiara influenza di fattori ambientali nell'aumentare il rischio di MSA.

L'MSA colpisce allo stesso modo uomini e donne, inizia generalmente nella sesta decade di vita e ha una progressione rapida con una sopravvivenza media di 6-9 anni. Alcuni studi hanno suggerito che il 30% circa dei pazienti con atassia tardiva sporadica e l'8% dei pazienti che si presentano con parkinsonismo alla fine svilupperanno un'MSA (1). Clinicamente si distinguono due presentazioni motorie: nell'80% dei pazienti predominano le caratteristiche parkinsoniane (sottotipo MSA-P) mentre l'atassia cerebellare è il sintomo principale nel 20% dei casi (sottotipo MSA-C).

La disautonomia è caratteristica sia dell'MSA-P che dell'MSA-C e comprende incontinenza o ritenzione urinaria, disfunzione erettile, stipsi, ipotensione ortostatica.

Quinn è stato il primo, nel 1989, a proporre dei criteri diagnostici per l'MSA (5) (Tabella 1), ma successivamente, nel 1998, un consensus di esperti ha proposto nuovi criteri diagnostici (6) (Tabella

2). Purtroppo entrambi i criteri hanno rivelato una bassa sensibilità e pertanto sono di scarso aiuto nella diagnosi dei casi iniziali (Tabella 3).

Tabella 1: Criteri di Quinn per la diagnosi di MSA

SND type (predominantly parkinsonism)	Diagnostic category	OPCA type (predominantly cerebellar)
Sporadic adult-onset non/poorly levodopa responsive parkinsonism*	Possible	Sporadic adult-onset cerebellar syndrome with parkinsonism
Above,† plus severe symptomatic autonomic failure‡ or cerebellar signs or pyramidal signs or pathologic sphincter EMG	Probable	Sporadic adult-onset cerebellar syndrome* (with or without parkinsonism or pyramidal signs), plus severe symptomatic autonomic failure‡ or pathologic sphincter EMG
Postmortem confirmed	Definite	Postmortem confirmed

* Without Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 3rd ed, rev (DSM-III-R) dementia, generalized tendon areflexia, prominent supranuclear palsy for downgaze, or other identifiable cause.

† Moderate or good, but often waning, response to levodopa may occur, in which case multiple atypical features need to be present.

‡ Postural syncope or marked urinary incontinence or retention not due to other causes.

Sporadic = no other case of multiple system atrophy among first- or second-degree relatives; adult-onset = onset at age 30 years or above.

Tabella 2: Criteri del Consensus per la diagnosi di MSA

<p>I. Autonomic and urinary dysfunction</p> <p>A. Features</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Orthostatic hypotension (by 20 mm Hg systolic or 10 mm Hg diastolic) 2. Urinary incontinence or incomplete bladder emptying <p>B. Criteria</p> <p>Orthostatic fall in blood pressure (by 30 mm Hg systolic or 15 mm Hg diastolic) or urinary incontinence (persistent, involuntary partial or total bladder emptying, accompanied by erectile dysfunction in men) or both</p>
<p>II. Parkinsonism</p> <p>A. Features</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Bradykinesia (slowness of voluntary movement with progressive reduction in speed and amplitude during repetitive actions) 2. Rigidity 3. Postural instability (not caused by primary visual, vestibular, cerebellar, or proprioceptive dysfunction) 4. Tremor (postural, resting or both) <p>B. Criteria</p> <p>Bradykinesia plus at least one of features 2–4</p>
<p>III. Cerebellar dysfunction</p> <p>A. Features</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Gait ataxia (wide based stance with steps of irregular length and direction) 2. Ataxic dysarthria 3. Limb ataxia 4. Sustained gaze-evoked nystagmus <p>Criteria</p> <p>Gait ataxia plus at least one of features 2–4</p>
<p>IV. Corticospinal tract dysfunction</p> <p>A. Features</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Extensor plantar responses with hyper-reflexia <p>Criteria</p> <p>Corticospinal tract dysfunction in MSA: no corticospinal tract features are used in defining the diagnosis of MSA</p>

I. Possible MSA

One criterion plus two features from separate other domains. When the criterion is parkinsonism, a poor levodopa response qualifies as one feature (hence only one additional feature is required).

II. Probable MSA

Criterion for autonomic failure or urinary dysfunction plus poorly levodopa-responsive parkinsonism or cerebellar dysfunction.

III. Definite MSA

Pathologically confirmed by the presence of a high density of glial cytoplasmic inclusions in association with a combination of degenerative changes in the nigrostriatal and olivopontocerebellar pathways.

Reproduced with permission from Elsevier.[13]

Tabella 3: Sensibilità e valore predittivo positivo dei criteri diagnostici per l'MSA alla prima visita neurologica e all'ultima visita prima del decesso (7).

	Sensibilità	PPV
Prima visita	22	92
Quinn possibile	63	82
Quinn probabile	37	95
Consensus possibile	28	93
Consensus probabile	16	100
Ultima visita	100	86
Quinn possibile	98	86
Quinn probabile	94	87
Consensus possibile	92	86
Consensus probabile	63	91

Pertanto sono stati effettuati molti studi per sviluppare test strumentali utili per supportare il sospetto clinico di MSA o escludere altre patologie. I test di funzionalità autonoma, cardiovascolare e vescicale, qualora alterati in fase precoce, rendono più probabile una diagnosi di MSA, ma la specificità di questi test rispetto ad altre malattie neurodegenerative è sconosciuta. L'elettromiografia dello sfintere anale rivela segni di degenerazione del nucleo di Onuf nell'80% dei pazienti con MSA, ma la prevalenza di queste alterazioni nelle fasi precoci di malattia è sconosciuta e la loro specificità è piuttosto bassa, in quanto alterazioni analoghe si riscontrano nella malattia di Parkinson (MP), nella stipsi cronica, dopo interventi chirurgici pelvici e dopo il parto per via vaginale.

La RMN dell'encefalo può mostrare diverse alterazioni caratteristiche: atrofia del putamen, atrofia olivopontocerebellare, segno della croce a livello pontino, stria putaminale iperintensa in T2. La SPECT con iodobenzamide marcata, un tracciante per i recettori dopaminergici postsinaptici, è alterata in pazienti con MSA rispetto ai pazienti con MP, ma non permette di differenziare l'MSA da altre forme di parkinsonismo atipico come la paralisi sopranucleare progressiva. La visualizzazione dei neuroni simpatici cardiaci attraverso la scintigrafia con metaiodobenzilguanidina è normale nei pazienti con MSA, mentre rivela una perdita simpatica postgangliare nella MP ed ha un'elevata sensibilità e specificità nella diagnosi differenziale tra MSA e MP (1).

2. SVILUPPO DI UN NUOVO TEST DIAGNOSTICO PER L'ATROFIA MULTISISTEMICA: IL TEST ALL'ARGININA

2.1 Premesse

La diagnosi differenziale tra MSA-P e MP può essere molto difficile nelle fasi iniziali a causa di caratteristiche cliniche simili come il tremore a riposo, l'acinesia o la rigidità asimmetriche. Inoltre, il miglioramento del parkinsonismo indotto dalla levodopa può essere presente nel 30% dei pazienti con MSA-P, anche se nella maggior parte di essi il beneficio è transitorio. Nella maggior parte dei casi un quadro clinico chiaro di MSA si sviluppa nel corso di diversi anni, permettendo una diagnosi clinica solo durante il follow-up (1). Infatti, una significativa percentuale di casi inizialmente diagnosticati come MP sono riconosciuti come MSA solo nel corso della malattia o all'esame anatomopatologico (8). La diagnosi differenziale tra queste due patologie è importante sia dal punto di vista prognostico, in quanto l'MSA ha una progressione di malattia molto più rapida della MP, sia dal punto di vista terapeutico, in quanto la risposta alla terapia dopaminergica nell'MSA è scarsa o assente.

La maggior parte dei pazienti con MSA-C sviluppano nel tempo segni e sintomi extracerebellari, ma nei primi anni sono spesso indistinguibili dai pazienti con atassia idiopatica cerebellare ad esordio tardivo (ILOCA), che hanno segni clinici per lo più limitati al cervelletto e una degenerazione esclusiva del cervelletto e dei nuclei olivari.

In uno studio del 1997, Kimber e coll. hanno riportato che la risposta dell'ormone della crescita alla stimolazione con clonidina è scarsa o assente nell'MSA, indicando una disregolazione del sistema noradrenergico centrale in quest'ultima, e ciò permette di differenziare tale patologia dalla MP idiopatica (9). Questi risultati tuttavia non sono stati confermati da studi successivi che mostravano invece una bassa sensibilità e/o specificità di questo test (10,11).

Primo obiettivo è stato quello di valutare la validità del test alla clonidina nella diagnosi differenziale tra MSA, MP, ILOCA e testare l'utilità di un diverso tipo di test di stimolo del GH, il test all'arginina, in queste patologie.

2.2 Pazienti e metodi

Sono stati studiati 12 pazienti con MSA (6 con MSA-P e 6 con MSA-C), 10 pazienti con MP, 8 pazienti con ILOCA e 30 controlli sani. Le caratteristiche demografiche dei soggetti studiati sono riassunte nella Tabella 4.

Tabella 4:

	MSA (n=12)	PD (n=8)	ILOCA (n=8)	Controlli (n=30)
Età (Media [ES])	62.2 (0.9)	62 (1.2)	61.2 (0.7)	62.5 (0.6)
Sesso (M/F)	7/5	7/3	6/2	20/10
Durata di malattia (Media [ES])	4 (0.5)	3 (0.4)	7.7 (1.3)	-

Nessuno dei pazienti incluso nello studio aveva assunto farmaci antiparkinsoniani per almeno un mese prima dell'esecuzione dei test. Tutti i pazienti sono stati sottoposti a valutazione basale della funzione ipofisaria, tiroidea, surrenalica e in particolare sono stati valutati i livelli di GH basale, IGF-I e l'IGF-binding protein 3 (IGF-BP3).

Il test alla clonidina e il test all'arginina sono stati effettuati in ciascun soggetto in sequenza randomizzata in due giorni non consecutivi. Dopo l'infusione di un catetere venoso, è stato effettuato il prelievo per il dosaggio basale del GH e quindi somministrata clonidina (Catapresan, 300 mcg per os) oppure infusa arginina (arginina cloridrato, 30 g in 100 ml in 30 min). Prelievi

seriati sono stati effettuati ogni 30 minuti fino a 2 ore dopo il prelievo basale. I campioni di sangue sono stati immediatamente centrifugati e i sieri congelati a -20°C. Il GH sierico è stato misurato usando un kit immunoradiometrico (IRMA). La sensibilità di questo kit è di 0,30 mU/L. L'IGF-I e l'IGF-BP3 plasmatiche sono state misurate usando kit IRMA.

I dati sono espressi come media \pm ES. Il picco sierico di GH è stato usato come variabile primaria per l'analisi statistica. Per il confronto tra i gruppi è stato utilizzato l'ANOVA seguito dal test di Bonferroni. Il cut-off adeguato a differenziare le patologie sulla base della risposta ai test di stimolo con la più alta sensibilità e specificità è stato stabilito con l'analisi ROC. La significatività è stata fissata al 5%.

2.3 Risultati

I valori basali di GH, IGF-I e IGF-BP3 erano simili nei pazienti e nei controlli.

In risposta alla stimolazione con clonidina, il GH aumentava nei pazienti con MP, ILOCA e nei controlli, ma non nei pazienti con MSA (Figura 1). Il picco di GH era significativamente inferiore negli MSA rispetto agli ILOCA ($p < 0.05$) e ai controlli ($p < 0.01$). Al cut-off ottimale di 5 mU/L, la sensibilità e la specificità del test nel distinguere i pazienti con MSA da quelli con MP erano dell'80% e del 75% rispettivamente, e del 100% e del 75% rispettivamente nel distinguere i pazienti con MSA da quelli con ILOCA (Figura 2).

In risposta alla stimolazione con arginina, il GH aumentava nei pazienti con MP, ILOCA e nei controlli, ma non nei pazienti con MSA (Figura 1). Il picco di GH era significativamente inferiore negli MSA rispetto agli ILOCA ($p < 0.001$) e ai controlli ($p < 0.001$). Al cut-off ottimale di 5 mU/L, la sensibilità e la specificità del test nel distinguere i pazienti con MSA da quelli con MP erano entrambe del 100%. Al cut-off ottimale di 3.6 mU/L la sensibilità e la specificità del test nel distinguere i pazienti con MSA da quelli con ILOCA erano del 100%. (Figura 2).

Figura 1:

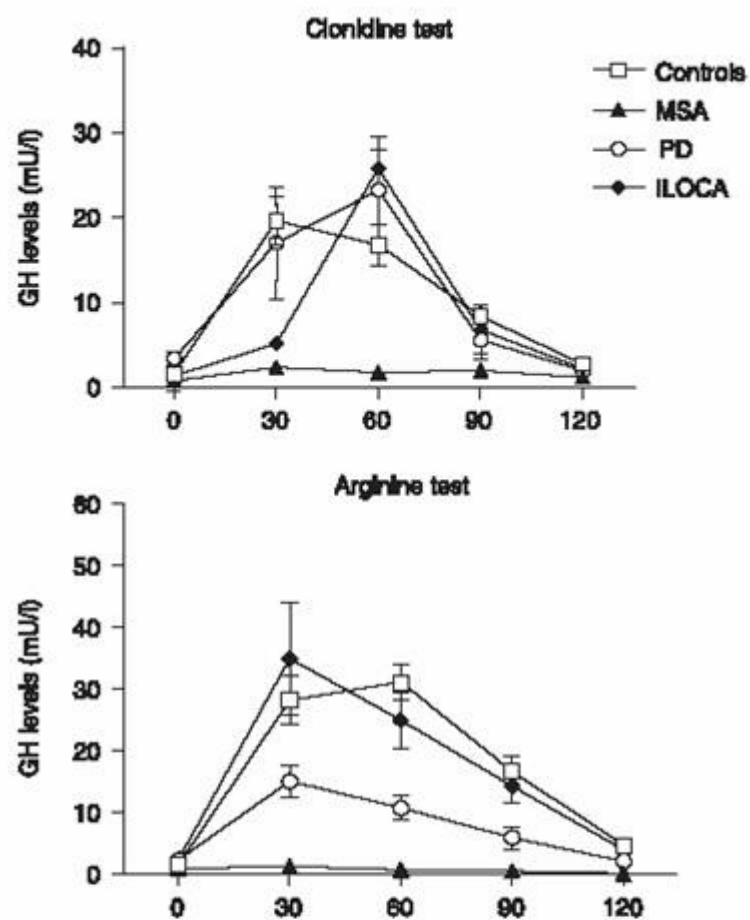
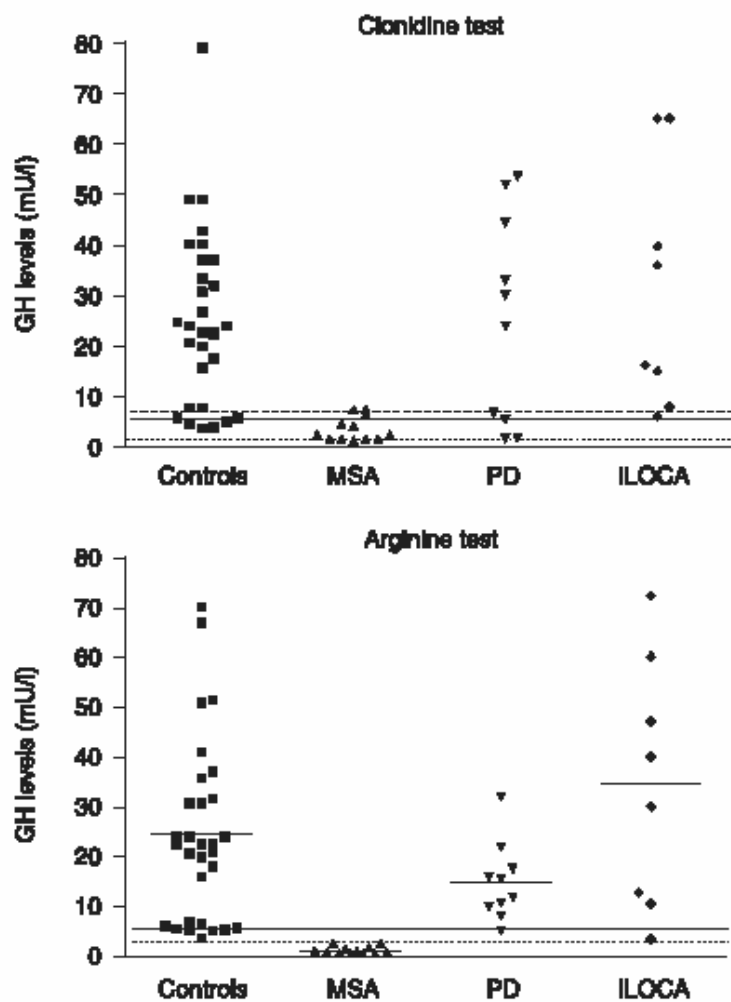


Figura 2:



Pertanto il test all'arginina si è dimostrato più accurato di quello alla clonidina nella diagnosi differenziale dell'MSA dalla MP e dall'ILOCA.

3. VALIDAZIONE DEL TEST ALL'ARGININA NELLA DIAGNOSI DELL'ATROFIA MULTISISTEMICA

3.1 Premesse

Alla luce dei risultati del primo studio, lo studio successivo si è proposto di validare il test all'arginina in una popolazione più ampia di pazienti con MSA, confrontati con pazienti affetti da MP. Infatti, prima di proporre questo test come nuovo strumento diagnostico nell'MSA, era necessario confermarne l'elevata sensibilità e specificità in un gran numero di pazienti.

3.2 Pazienti e metodi

Trentacinque pazienti con MP e settanta pazienti con atrofia multisistemica (43 MSAp, 27 MSAc) hanno partecipato allo studio. Dopo un prelievo basale, è stata infusa arginina cloridrato i.v. in 30 minuti alla dose di 30 g. Sono stati eseguiti prelievi ogni 30 minuti per un'ora dalla fine dell'infusione di arginina. I campioni di sangue sono stati centrifugati e il siero è stato conservato a -20°C. Il GH sierico è stato determinato con metodica IRMA. Come variabile primaria per l'analisi statistica è stato usato il picco sierico del GH. Per il confronto tra i gruppi è stato utilizzato l'ANOVA seguito dal test di Bonferroni. Il cut-off adeguato a differenziare le patologie sulla base della risposta ai test di stimolo on la più alta sensibilità e specificità è stato stabilito con l'analisi ROC. La significatività è stata fissata al 5%.

3.3 Risultati

La tabella 5 mostra le caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti studiati. Non c'erano differenze significative per quanto riguarda l'età e la durata di malattia tra i gruppi.

Tabella 5:

	MP	MSAp	MSAc
	(n=35)	(n = 43)	(n = 27)
Sesso (M/F)	23/12	26/17	11/16
Età (media \pm DS)	60.6 \pm 9.3	63.9 \pm 5.9	61.5 \pm 7.4
Durata malattia (media \pm DS)	3.1 \pm 2.3	3.8 \pm 1.7	4.2 \pm 3.2

Dopo la somministrazione di arginina, il picco di GH si è mostrato significativamente più basso nei pazienti con MSA che in quelli con MP idiopatica ($p < 0.0001$) (Figura 3). Ad un valore di cut-off del picco di GH di 4 mcg/l il test all'arginina distingue la MP dalla MSAp con una sensibilità e una specificità del 91%, e la MP dalla MSAc con una sensibilità del 91% e una specificità del 96% (Figura 4). Non c'è correlazione tra la risposta del GH e la durata di malattia nei vari gruppi.

Figura 3:

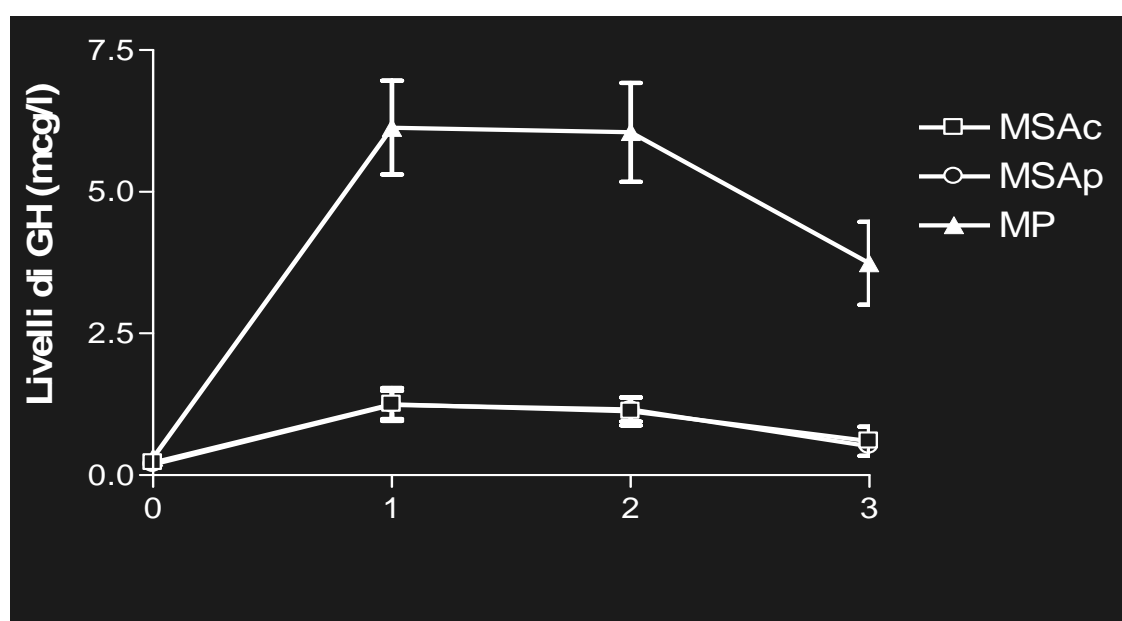
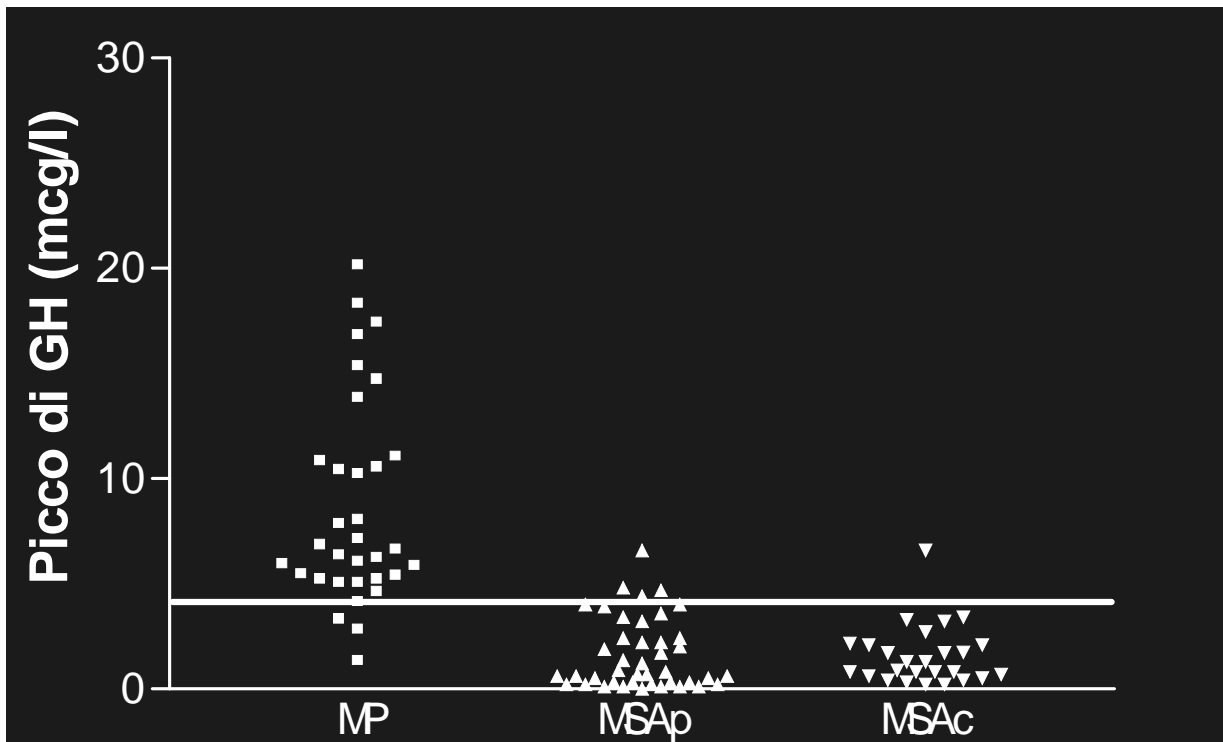


Figura 4:



3.4 Discussione

I risultati di questi studi dimostrano che la risposta del GH alla stimolazione con arginina differenzia l'MSA dalla MP e dall'ILOCA. La ricaduta clinica di questi studi si avrà soprattutto nella diagnosi differenziale delle forme iniziali di parkinsonismo, per la quale finora sono state utilizzate molte indagini neurofisiologiche e strumentali, la cui bassa accuratezza o praticabilità sono tuttavia state dimostrate in diversi studi (1). Il test all'arginina, oltre all'elevata accuratezza, ha infatti il pregio di essere un test di facile esecuzione, privo di effetti collaterali e di basso costo rispetto ad altri esami diagnostici.

La secrezione del GH dall'ipofisi è regolata da una complessa rete neuroormonale (12). La secrezione del GH è stimolata dal GHRH e inibita dalla somatostatina. Sia il GHRH che la somatostatina sono neuroormoni ipotalamici, la cui secrezione pulsatile è modulata da diverse reti neuronali, soprattutto vie noradrenergiche e colinergiche (12). L'attivazione dei recettori alfa2-adrenergici da parte della clonidina induce il rilascio del GH attraverso la stimolazione del GHRH,

mentre l'attivazione dei recettori colinergici muscarinici da parte dell'arginina induce il rilascio del GH attraverso l'inibizione della somatostatina.

La risposta del GH alla clonidina è stata proposta come test differenziale tra MSA e MP da Kimber e coll. (9) nel 1997. Questi autori non osservarono aumento del GH dopo stimolazione con clonidina nei pazienti con MSA, mentre nei pazienti con MP la risposta era preservata. Studi successivi non hanno confermato questi risultati e l'utilizzo del test alla clonidina nella diagnosi differenziale di queste due patologie è controverso (10,11). I risultati del mio studio confermano che non c'è una differenza significativa nella risposta alla clonidina tra MSA e MP, in quanto un'assente risposta del GH alla clonidina si osserva nella gran parte dei pazienti con MSA ma anche in alcuni pazienti con MP. Questo indica che il test alla clonidina ha una bassa accuratezza diagnostica in queste patologie. La base neuropatologica dell'assente risposta alla clonidina nell'MSA e in un parte dei pazienti con MP potrebbe essere la perdita di neuroni catecolaminergici che proiettano all'ipotalamo. Una perdita di neuroni catecolaminergici è stata chiaramente dimostrata a livello del bulbo ventrolaterale nell'MSA (13) e può essere presente anche nella MP, in cui, oltre alla degenerazione del sistema nigrostriatale, è frequente il riscontro di degenerazione dei neuroni catecolaminergici del locus coeruleus (11). Il test alla clonidina ha dimostrato anche una bassa accuratezza diagnostica nel differenziare l'MSA dall'ILOCA. Pertanto, il test alla clonidina probabilmente non ha un'utilità pratica nell'identificazione di singoli pazienti con MSA, MP e ILOCA.

Il test all'arginina non è stato mai utilizzato prima d'ora nello studio di patologie neurodegenerative quali l'MSA, la MP e l'ILOCA. La ragione per cui la risposta del GH all'arginina è ridotta o assente nell'MSA, ma non nella MP o nell'ILOCA è quindi sconosciuta, ma è possibile fare un'ipotesi. Considerando che l'arginina inibisce la somatostatina ipotalamica probabilmente attraverso la mediazione del sistema colinergico (14), si dovrebbe presumere che solo nell'MSA, e non nella MP e nell'ILOCA, ci sia un danno del sistema colinergico coinvolto nel controllo ipotalamico della secrezione del GH. Una via colinergica intraipotalamica che può modulare la funzione dell'ipofisi

anteriore è stata dimostrata sia nell'animale che nell'uomo (15,16). Evidenze di un'alterazione delle vie colinergiche intraipotalamiche nell'MSA provengono da studi clinici e anatomopatologici (17,18). L'analisi biochimica dell'ipotalamo di pazienti con MSA deceduti ha mostrato una marcata perdita di attività acetilcolin-transferasica, che è un marcatore dei neuroni colinergici (17).

Un'alterata risposta della vasopressina ai farmaci colinomimetici è stata inoltre riportata in pazienti con MSA, suggerendo un danno dei neuroni colinergici intraipotalamici (18). Tuttavia, non si può escludere che nella mancata risposta del GH all'arginina possa giocare un ruolo anche una perdita di fibre colinergiche extraipotalamiche. Infatti, proiezioni ascendenti all'ipotalamo provengono dai nuclei colinergici del tronco encefalico, come il nucleo peduncolopontino e il nucleo laterodorsale del tegmento, che sono alterati nell'MSA (19).

Ad ogni modo i risultati del mio studio suggeriscono che ci sia un risparmio del sistema colinergico centrale che modula il rilascio di GH nella MP e nell'ILOCA, ma non nell'MSA. La conferma di un'elevata sensibilità e specificità diagnostica del test all'arginina in un elevato numero di pazienti con MSA comparati con pazienti con MP idiopatica suggerisce che tale test possa avere un ampio utilizzo in futuro nella diagnosi differenziale dei parkinsonismi.

4. STUDIO DELLA RMN CON DIFFUSIONE PER LA QUANTIFICAZIONE DEL DANNO TISSUTALE NELL'ATROFIA MULTISISTEMICA DI TIPO PARKINSONIANO E DI TIPO CEREBELLARE

4.1 Premesse

La RMN di routine può mostrare alcune alterazioni caratteristiche sia nell'MSA-P che nell'MSA-C, la cui sensibilità e il cui valore predittivo nella diagnosi di questa patologia neurodegenerativa sono mostrati nelle Tabelle 6 e 7. La specificità di queste alterazioni RMN è elevata, ma la variabile e spesso bassa sensibilità delle stesse spiega perché la RMN di routine fallisca nella diagnosi differenziale tra MSA e MP fino al 44% dei casi (20).

Tabella 6: Sensibilità e valore predittivo positivo delle alterazioni RMN a livello dei nuclei della base nell'MSA

Alterazioni dei nuclei della base	Sensibilità	PPV
Atrofia putaminale	60%	100%
Stria iperintensa periputaminale	80%	89%
Ipointensità putaminale + stria iperintensa periputaminale	60%	100%

Tabella 7: Sensibilità e valore predittivo positivo delle alterazioni RMN sottotentoriali nell'MSA

Alterazioni sottotentoriali	Sensibilità	PPV
Atrofia pontina	57%	69%
Atrofia del peduncolo cerebellare medio	56%	84%
Dilatazione del IV ventricolo	56%	94%
Atrofia bulbare	44%	88%
Segno della croce	50%	97%
Iperintensità del peduncolo cerebellare medio	50%	93%
Iperintensità cerebellare	30%	100%
Iperintensità delle olive inferiori	13%	100%

Un recente studio ha dimostrato che la RMN con diffusione (DWI) è in grado di discriminare accuratamente i pazienti con MP da quelli con MSA-C (21). In questo studio i pazienti con MSA-P mostravano un aumento della diffusione nel putamen, indice di danno tissutale, rispetto ai pazienti con MP (21).

La diffusione è una tecnica comunemente utilizzata per misurare il movimento casuale delle molecole di acqua che si muovono lungo le fibre del sistema nervoso centrale, mentre la diffusione perpendicolare ai tratti di fibre nervose è limitata. A differenza della RMN convenzionale, la DWI permette la quantificazione del danno tissutale. La quantificazione della diffusione è possibile applicando gradienti di campo con differente grado di sensibilità alla diffusione, permettendo così il calcolo del coefficiente di diffusione apparente (ADC) nel tessuto studiato. La traccia del tensore di diffusione è data dalla media delle ADC misurate in tre direzioni ortogonali ed è più sensibile alle alterazioni patologiche rispetto all'ADC misurata in un'unica direzione poiché i tratti di fibre non

sono orientati nella stessa direzione (22). I processi patologici come la perdita neuronale e la secondaria gliosi rimuovono alcune delle barriere che limitano la diffusione dell'acqua, aumentando la mobilità dell'acqua all'interno del tessuto. Quindi, i processi patologici che modificano l'integrità tissutale risultano in un aumento dell'ADC.

Obiettivi del mio studio sono stati:

- valutare l'utilità della DWI nella conferma della diagnosi di MSA, sia del tipo Parkinsoniano (MSA-P) che del tipo Cerebellare (MSA-C),
- quantificare il danno tissutale a livello del putamen e del tronco encefalico nelle due forme della malattia
- correlare il danno tissutale, misurato con la DWI, con la gravità clinica, misurata con una scala specifica per l'MSA, recentemente validata (UMSARS)

.

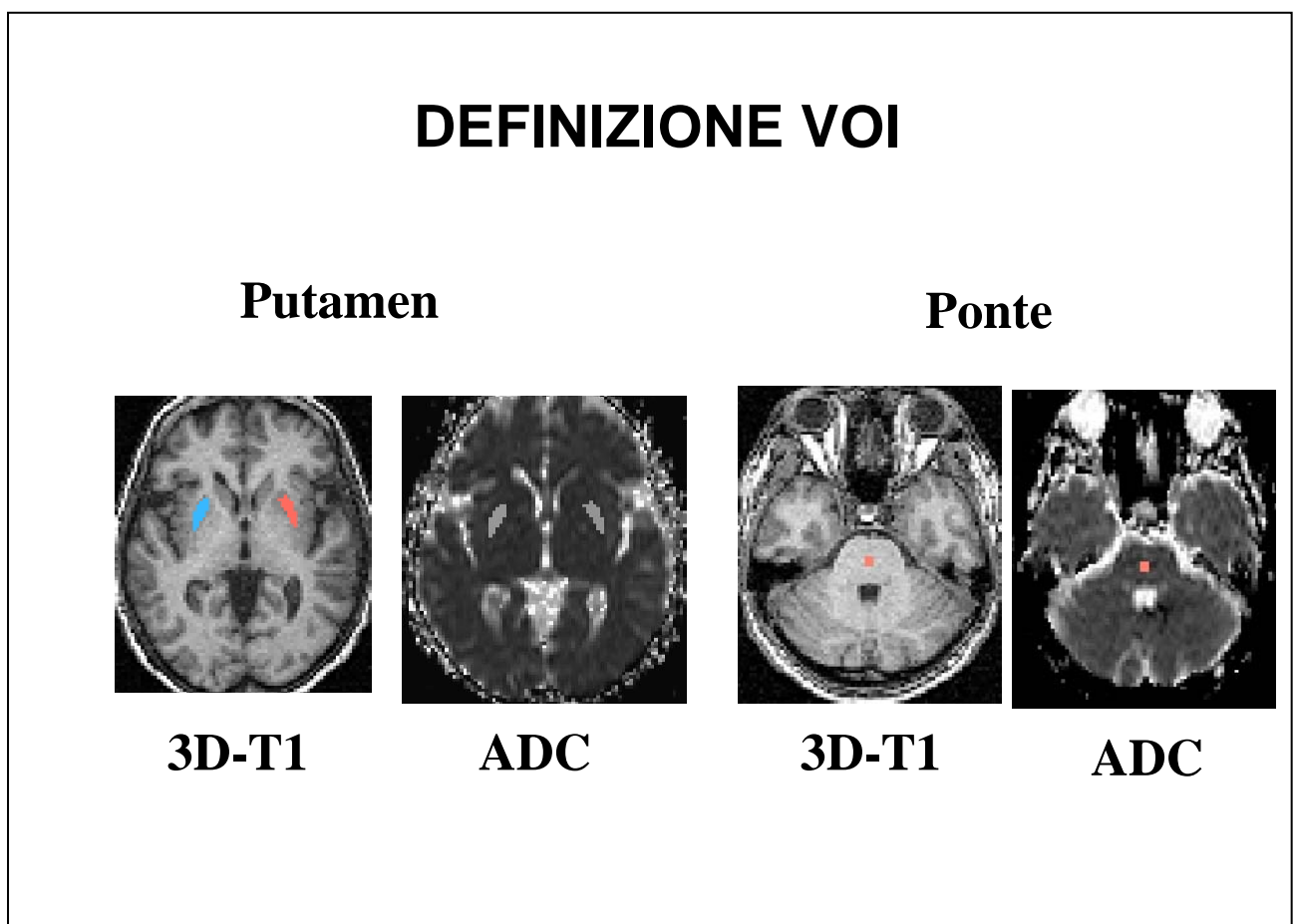
4.2 Pazienti e metodi

Sono stati studiati 10 pazienti con MSA-P (5M/5F; età: 67 ± 7 , durata di malattia: 4 ± 1.5 anni), 10 pazienti con MSA-C (5M/5F ; età: 59 ± 5 , durata di malattia: 5 ± 4 anni), e 10 controlli sani (6M/4F, età: 56 ± 10 anni). La diagnosi clinica di MSA è stata fatta in base ai criteri del Consensus (6). A ogni paziente è stata somministrata la scala UMSARS parte II per valutare il grado di compromissione clinica. La tabella 8 mostra gli items della scala UMSARS (23).

Tabella 8. Unified Multiple System Atrophy Rating Scale (23)
<p>Part I: Historical review</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Speech 2. Swallowing 3. Handwriting 4. Cutting food and handling utensils 5. Dressing 6. Hygiene 7. Walking 8. Falling (the past month is rated) 9. Orthostatic symptoms 10. Urinary function 11. Sexual function 12. Bowel function
<p>Part II: Motor Examination Scale</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Facial expression 2. Speech 3. Ocular motor dysfunction 4. Tremor at rest 5. Action tremor 6. Increased tone 7. Rapid alternating movements of hands 8. Finger taps 9. Leg agilità 10. Heel-knee-shin test 11. Arising from chair 12. Posture 13. Body sway 14. Gait
<p>Part III: Autonomic examination</p> <p>Systolic/diastolic blood pressure and heart rate are measured after 2 minutes of rest in supine position and again after 2 minutes of standing</p>
<p>Part IV: Global Disability Scale</p> <p>Stage 1 (completely independent) to 5 (totally dependent and helpless; bedridden)</p>

Per l'acquisizione delle immagini è stato utilizzato un sistema RM a 1.5 Tesla (Gyroscan Intera, Philips). Le immagini DWI sono state ottenute utilizzando una sequenza echoplanar spin-echo con gradienti di diffusione nelle tre direzioni x, y, z e 3 differenti valori di b (0, 500 e 1000 s/mm²). La sequenza DWI ha fornito 40 fette dello spessore di 3 mm. Il tempo di acquisizione di ciascuna fetta era di 5 secondi. Le sequenze B0 sono state normalizzate spazialmente (spazio MNI (Montreal Neurological Institute, template EPI, SPM 2000, Statistical Parametric Mapping) e i valori di ADC sono stati ottenuti per il putamen e per il ponte a partire da volumi di interesse (VOI) disegnati manualmente sulle immagini di B0. Immagini rappresentative dei VOI sono mostrate nella figura 5.

Figura 5:

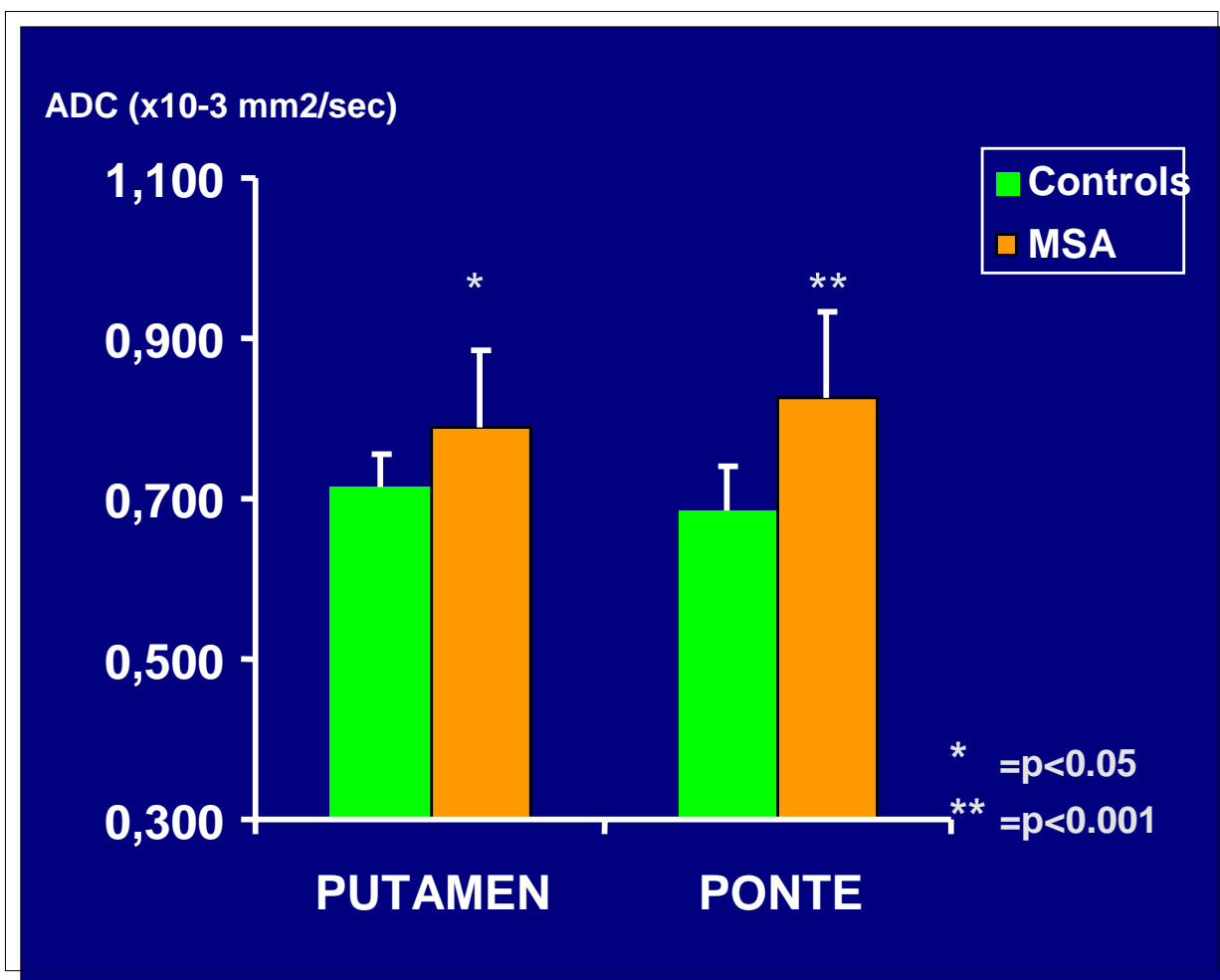


La differenze tra i gruppi sono state studiate attraverso il t-test.

4.3 Risultati

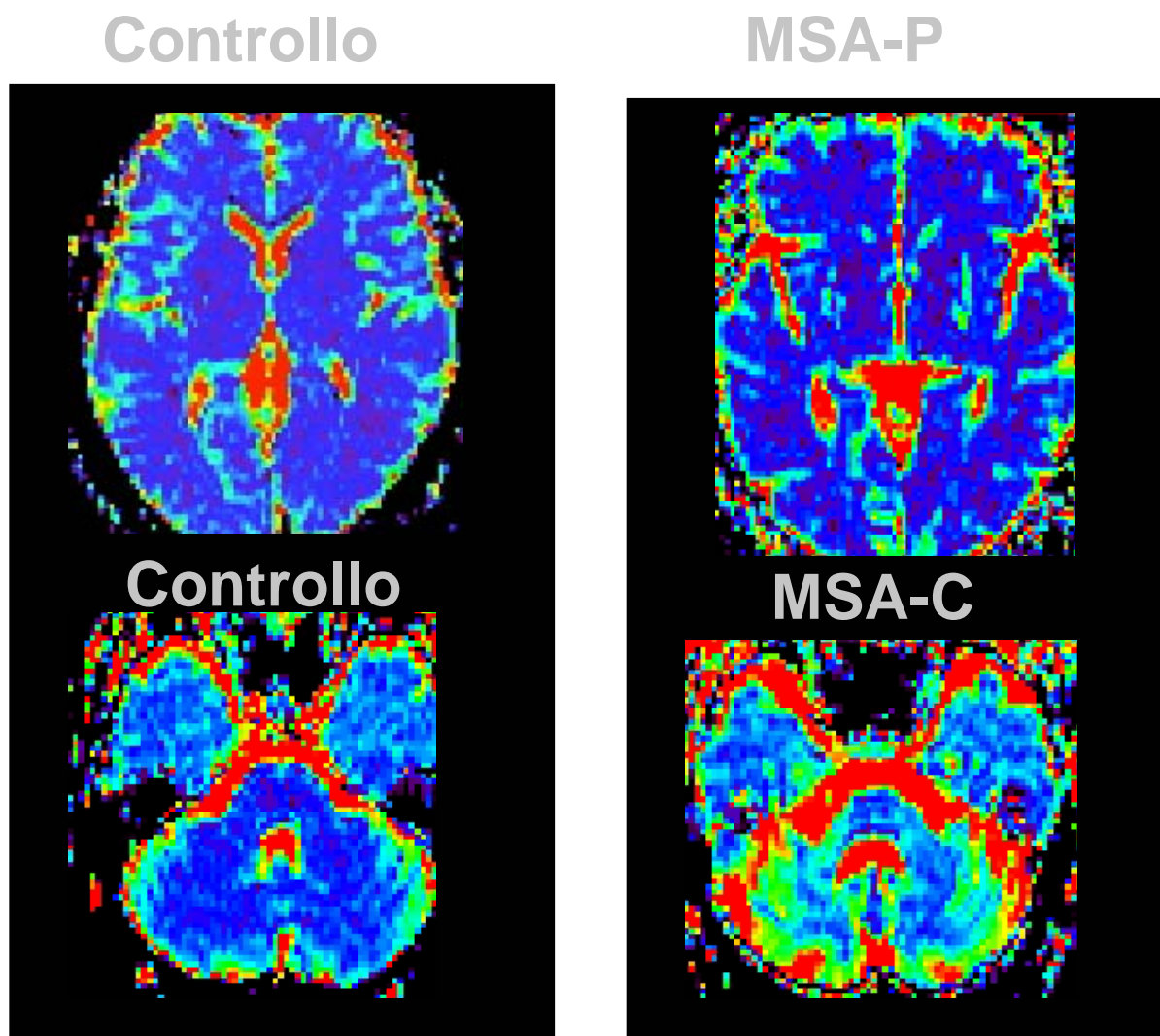
Nei pazienti con MSA globalmente considerati, i valori di ADC medi del putamen sono risultati 792 ± 101 versus 702 ± 32 nei controlli ($p < 0.05$) e i valori di ADC medi del ponte sono risultati 815 ± 107 versus 695 ± 66 nei controlli ($p < 0.001$). In entrambe le regioni quindi i valori di ADC sono risultati significativamente aumentati rispetto ai controlli (vedi Figura 6).

Figura 6:



La figura 7 mostra un esempio dell'aumento dell'ADC a livello del putamen in un'MSA-P e del ponte in un'MSA-C rispetto ad un controllo sano.

Figura 7:

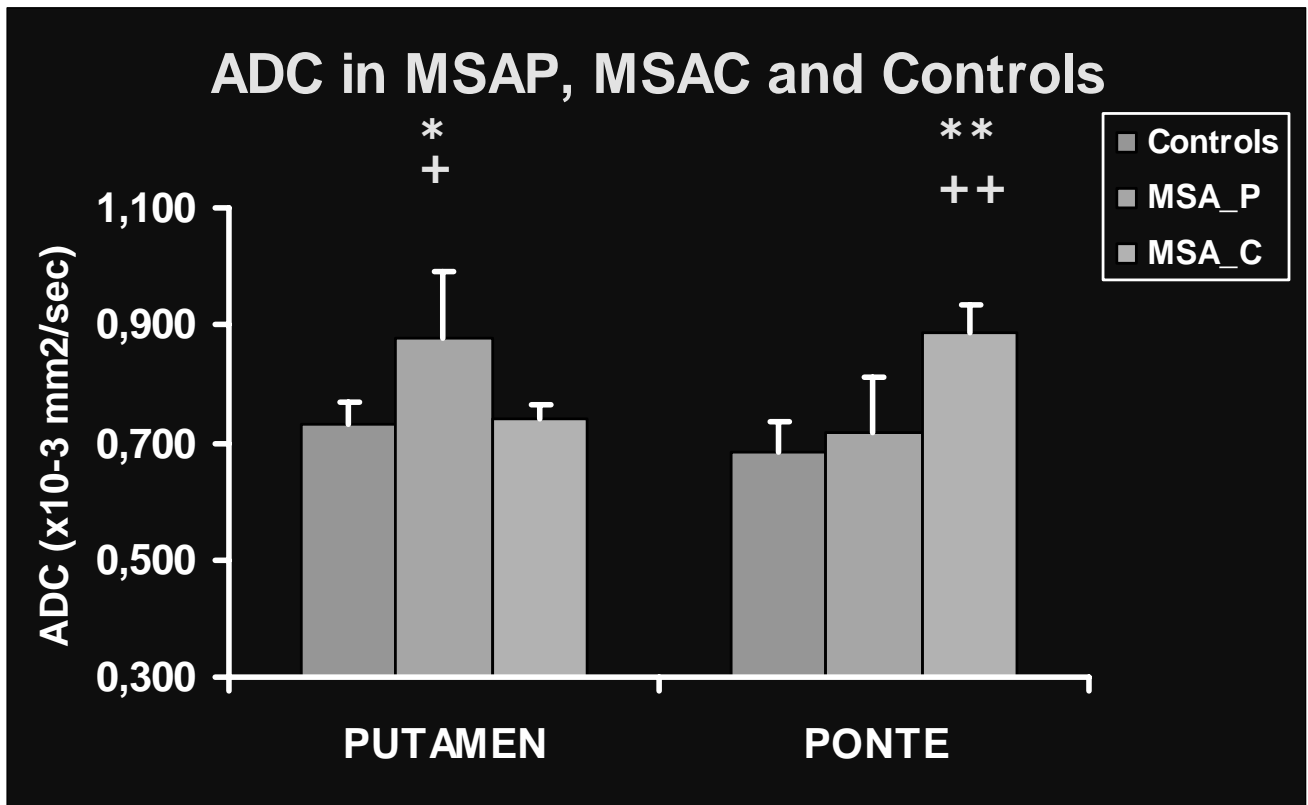


Considerando separatamente i pazienti con MSA-P e quelli con MSA-C, si osserva che i valori di ADC medi nel putamen sono significativamente aumentati nell'MSA-P rispetto ai controlli (849 ± 117 versus 702 ± 32 ; $p < 0.05$) ma non nell'MSA-C rispetto ai controlli (734 ± 24 versus 702 ± 32 ; $p > 0.05$). Allo stesso modo i valori di ADC medi nel ponte sono risultati significativamente aumentati nell'MSA-C rispetto ai controlli (887 ± 46 versus 695 ± 66 ; $p < 0.001$), ma non nell'MSA-P rispetto ai controlli (734 ± 94 versus 695 ± 66 ; $p > 0.05$). I valori di ADC medi del putamen nell'MSA-

P sono inoltre significativamente maggiori rispetto all'MSA-C ($p<0.01$), mentre i valori di ADC medi del ponte nell'MSA-C sono significativamente maggiori rispetto all'MSA-P ($p<0.001$).

La figura 8 mostra graficamente questi risultati.

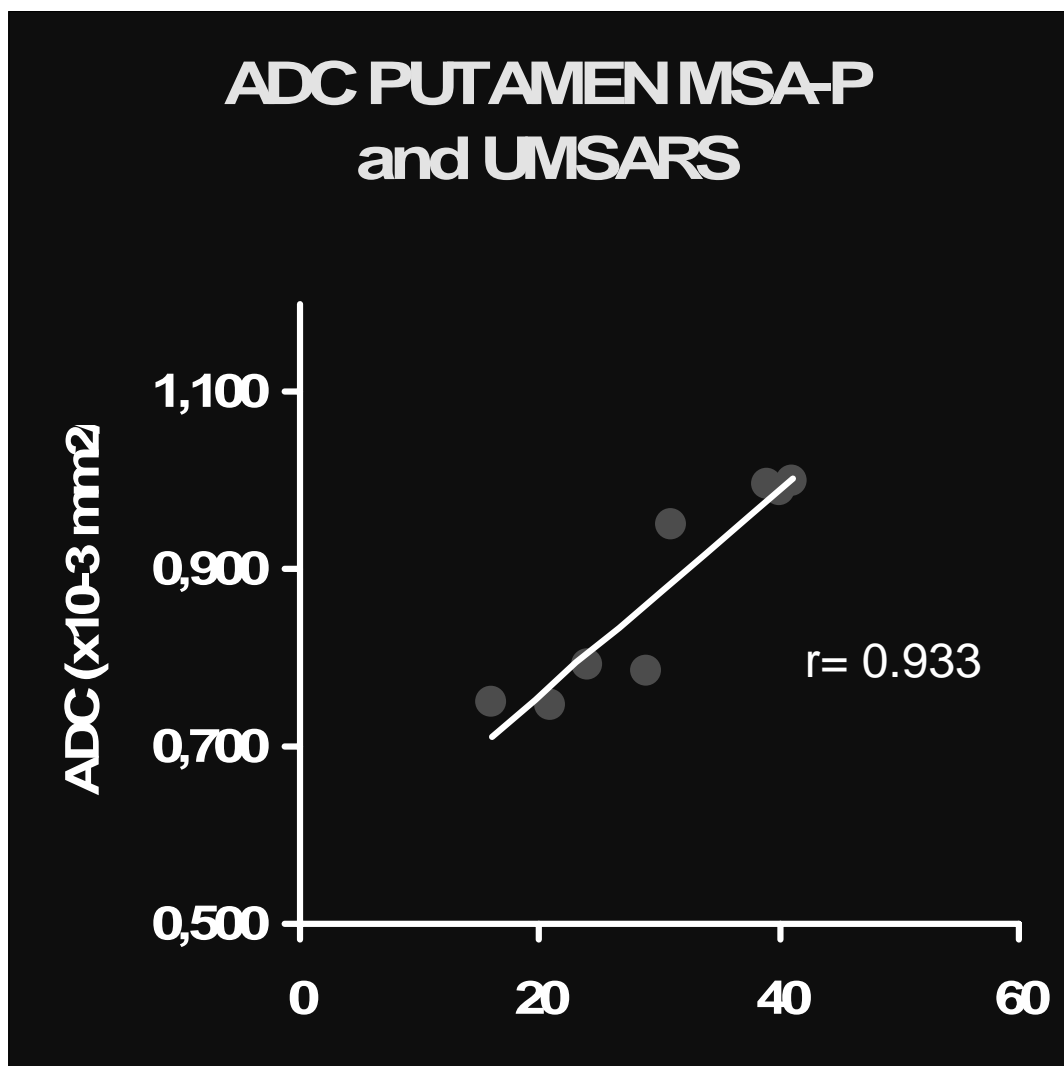
Figura 8:



* : $p<0.05$ vs controls; **: $p<0.001$ vs controls; + : $p<0.01$ MSA-C vs MSA-P; ++: $p<0.001$ MSA-C vs MSA-P

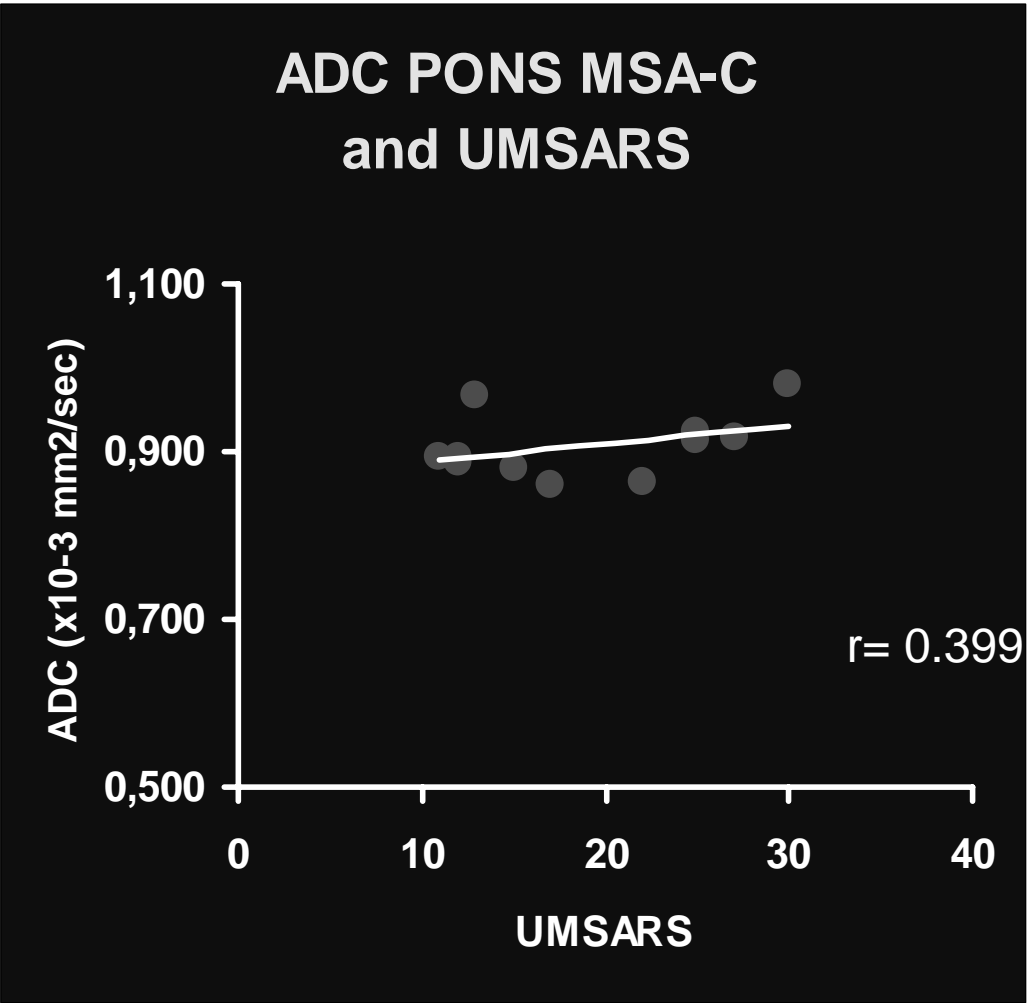
I valori di ADC non correlavano con la durata di malattia nell'MSA-P e nell'MSA-C. L'ADC del putamen mostrava invece una chiara correlazione ($r = 0.933$; $p < 0.01$) con il punteggio UMSARS nei pazienti con MSA-P (Figura 9).

Figura 9:



Non si osservava invece una correlazione tra il punteggio UMSARS e i valori di ADC nell'MSA-C (Figura 10).

Figura 10:



4.4 Discussione

I risultati di questo studio mostrano che la DWI è una tecnica utile per confermare la diagnosi di MSA, in quanto permette di rivelare il coinvolgimento delle strutture tipicamente coinvolte nella patogenesi della malattia, striato e tronco encefalico. In particolare, si osservava un aumento dell'ADC nel putamen e nel ponte nei pazienti con MSA-P e MSA-C, un danno cioè microstrutturale di queste regioni anche in assenza di alterazioni macrostrutturali specifiche alla RMN convenzionale. Questo suggerisce che questa tecnica possa essere utilizzata in fase precoce per diagnosticare la malattia.

La DWI ha mostrato che l'alterazione putaminale è più prominente nell'MSA-P, mentre quella del tronco encefalico è più importante nell'MSA-C e questi risultati sono in linea con i dati anatomopatologici riguardanti la malattia (1). Infatti, nell'MSA-P il sistema nigrostriatale è la principale sede di patologia, mentre nell'MSA-C il sistema olivopontocerebellare è quello maggiormente colpito con perdita dei neuroni pontini e delle fibre traverse pontocerebellari. Se questi dati fossero confermati, un'alterazione precoce dell'ADC a livello putaminale o pontino potrebbe verosimilmente consentire di prevedere lo sviluppo di una forma prevalentemente parkinsoniana o cerebellare di MSA.

La quantizzazione del danno tissutale a livello putaminale correla in maniera significativa con la gravità di malattia, misurata con l'UMSARS. Questo dato conferma la validità di questa nuova scala nel valutare la gravità di malattia e suggerisce che sia la DWI che l'UMSARS siano strumenti validi per seguire la progressione di malattia. La mancanza tuttavia di una correlazione tra il danno tissutale a livello pontino e l'UMSARS nell'MSA-C potrebbe indicare che la scala non misura adeguatamente i disturbi legati alla degenerazione pontocerebellare. E' anche possibile che l'assenza di correlazione con la severità clinica dell'MSA-C sia legata alla misurazione della diffusione a livello pontino, che è facilmente viziata da artefatti da echoplanar. Per chiarire questo aspetto potrebbe essere utile misurare la diffusione a livello del peduncolo cerebellare medio, che è meno sensibile ad artefatti.

La DWI è un'utile e innovativa metodica per la quantizzazione del danno nell'MSA. La correlazione con la severità clinica nell'MSA-P suggerisce che essa possa essere utilizzata per monitorare la progressione di malattia e per valutare l'efficacia di nuove terapie sperimentali.

5. STUDIO PROSPETTICO DELLA STORIA NATURALE DELL'ATROFIA MULTISISTEMICA: PROGRESSIONE DELLA MALATTIA IN UN ANNO

5.1 Premesse

La progressione dell'MSA è molto più rapida di quella della MP, ma la progressione può variare considerevolmente da individuo a individuo (24). Fino ad oggi mancano studi che definiscano in maniera prospettica la velocità e i fattori predittivi di progressione dell'MSA. Pertanto abbiamo intrapreso uno studio per valutare prospetticamente la storia naturale della malattia usando una scala specifica per l'MSA, l'UMSARS, sviluppata e validata nell'ultimo anno (23).

5.2 Pazienti e metodi

Sono stati reclutati 50 pazienti, con diagnosi di MSA-P o MSA-C secondo i criteri del Consensus (6). E' stata effettuata una valutazione basale e dopo un follow-up di un anno. Sono stati raccolti dati demografici, sul tipo di presentazione clinica (parkinsonismo, disautonomia, atassia cerebellare) e sulla terapia in corso. Sono state somministrate le seguenti scale di valutazione: UMSARS, stadiazione del parkinsonismo secondo Hoehn & Yahr (Stadio HY), Scala per la valutazione delle attività di vita quotidiana di Schwab & England (SE ADL), Scala di severità globale della malattia in 3 punti (SS3). L'UMSARS comprende una Parte I di raccolta anamnestica, una parte II di valutazione motoria, una parte III di valutazione autonoma e una parte IV di valutazione della disabilità globale.

L'analisi statistica è stata effettuata con l'SPSS 12.0 per Windows. La progressione di malattia è stata definita come la differenza tra i punteggi del follow-up e quelli basali di UMSARS, HY, SE ADL, e SS3. La variazione tra basale e follow-up è stata calcolata in relazione percentuale al valore basale dei rispettivi punteggi. La progressione è stata analizzata confrontando i punteggi basali versus quelli del follow-up attraverso il test di Wilcoxon. Per la correlazione tra le variazioni dell'UMSARS e le variazioni nelle misure di severità globale della malattia, sono stati calcolati i

coefficienti di correlazione per ranghi di Spearman. La valutazione della differenza di progressione di malattia in base a diversi fattori basali categoriali (sesso, sottotipo motorio, categoria diagnostica e presenza o assenza di caratteristiche diagnostiche cardinali) è stata fatta con il test U di Mann Whitney. Inoltre, per identificare eventuali caratteristiche basali associate ad una rapida progressione, sono stati calcolati i coefficienti di correlazione di Spearman tra variazioni dei punteggi dell'UMSARS parte I e dell'UMSARS parte II e i seguenti parametri basali: età, durata di malattia, punteggi UMSARS I e II, HY, SE ADL e SS3.

5.3 Risultati

La caratteristiche basali dei pazienti sono elencate nella tabella 9.

Tabella 9:

Caratteristica	Valore
Rapporto maschi-femmine	1:0.9
Età all'esordio (anni) media, mediana, DS	55.8, 55.0, 8.4
Età alla visita basale (anni) media, mediana, DS	61.1, 60.0, 7.9
Durata di malattia alla visita basale (anni) media, mediana, DS	5.3, 4.0, 3.5
Stadio HY (mediana, range)	3.5, 2.7 - 4,4
SE ADL (mediana, range)	56.0, 37.7 - 71.4
SS3 (mediana, range)	2.2, 1.5 - 2.8
Disautonomia (%)	96.0
Segni parkinsoniani (%)	100
Disfunzione cerebellare(%)	78.0
Segni piramidali (%)	54.0

Il 58% dei pazienti studiati aveva una predominanza di segni parkinsoniani (MSA-P) e il 42% una predominanza di segni cerebellari (MSA-C); il 16% rispondeva ai criteri diagnostici di MSA possibile e l'84% a quelli di MSA probabile.

Progressione dell'UMSARS

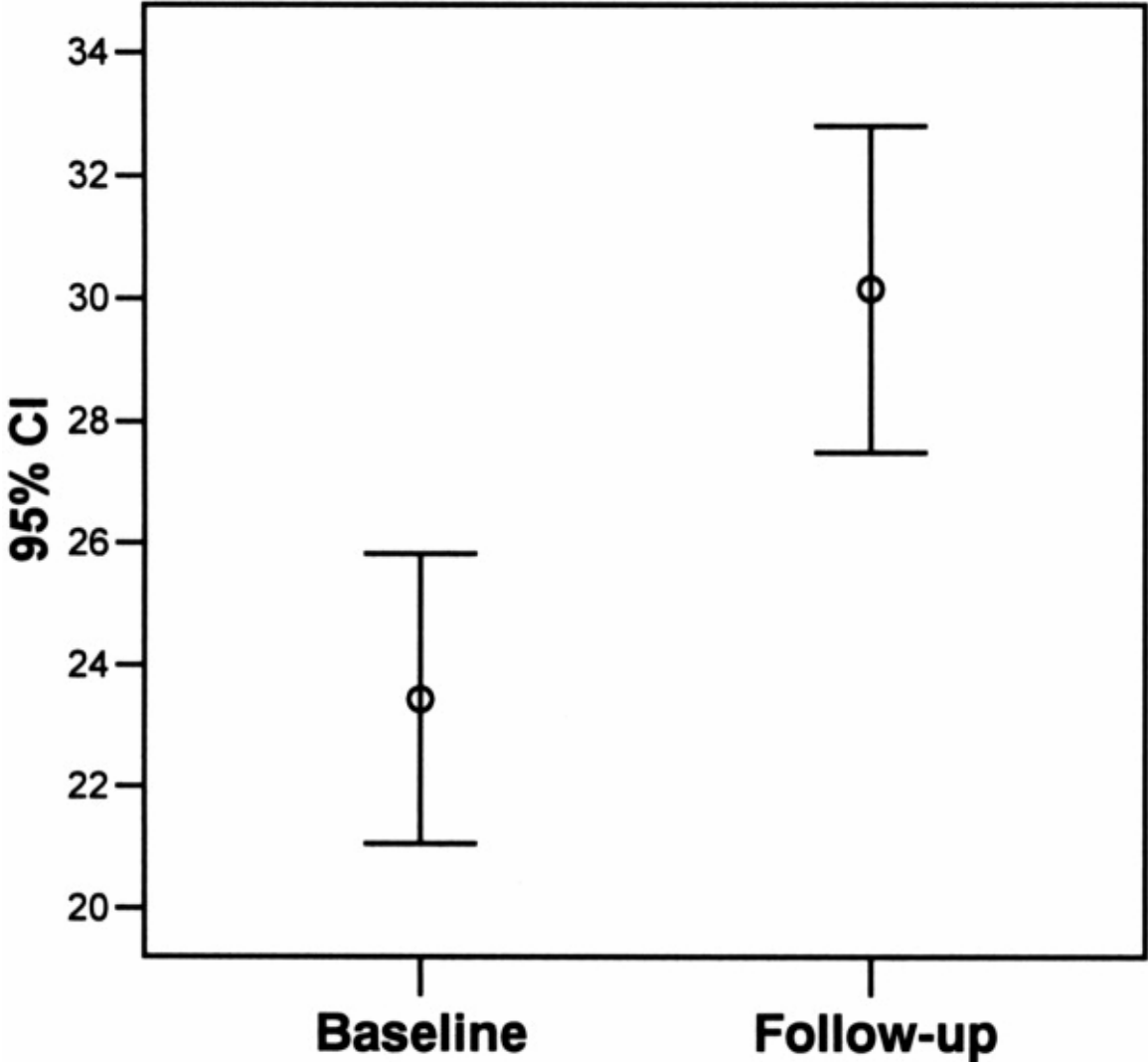
Tutte le scale hanno mostrato un peggioramento significativo al follow-up rispetto alla visita basale (Tabella 10).

Tabella 10:

Punteggi basali e al follow-up						
Parametro	Punteggio massimo	Basale, media (mediana, DS)	Follow-up, media (mediana, DS)	Differenza tra follow-up e basale, media (mediana, 95% CI)	Differenza tra follow-up e basale (%), media (mediana, 95%CI)	P
UMSARS I	48	23.4 (22.2, 8.4)	30.2 (28.3, 9.4)	6.7 (6.3, 5.1 to 8.3)	35.6 (27.1, 23.6 to 47.5)	<0.0001
UMSARS II	56	23.8 (23.0, 8.5)	33.4 (33.5, 9.0)	9.6 (7.8, 7.5 to 11.7)	57.3 (33.3, 33.9 to 80.7)	<0.0001
UMSARS IV	5	2.9 (2.9, 1.1)	3.7 (3.8, 1.0)	0.8 (0.7, 0.5 to 1.0)	33.3 (25.0, 22.1 to 44.6)	<0.0001
HY	5	3.5 (3.5, 1.1)	4.0 (4.2, 1.0)	0.5 (0.5, 0.4 to 0.7)	20.9 (16.4, 8.2 to 33.7)	<0.0001
SE ADL	100	54.4 (56.0, 21.5)	40.2 (38.8, 21.6)	-14.2 (-11.9, -18.8 to -9.6)	-27.1 (-23.4, -35.6 to -18.6)	<0.0001
SS3	3	2.1 (2.2, 0.7)	2.4 (2.5, 0.6)	0.3 (0.3, 0.1 to 0.5)	22.3 (18.3, 11.3 to 33.4)	0.001

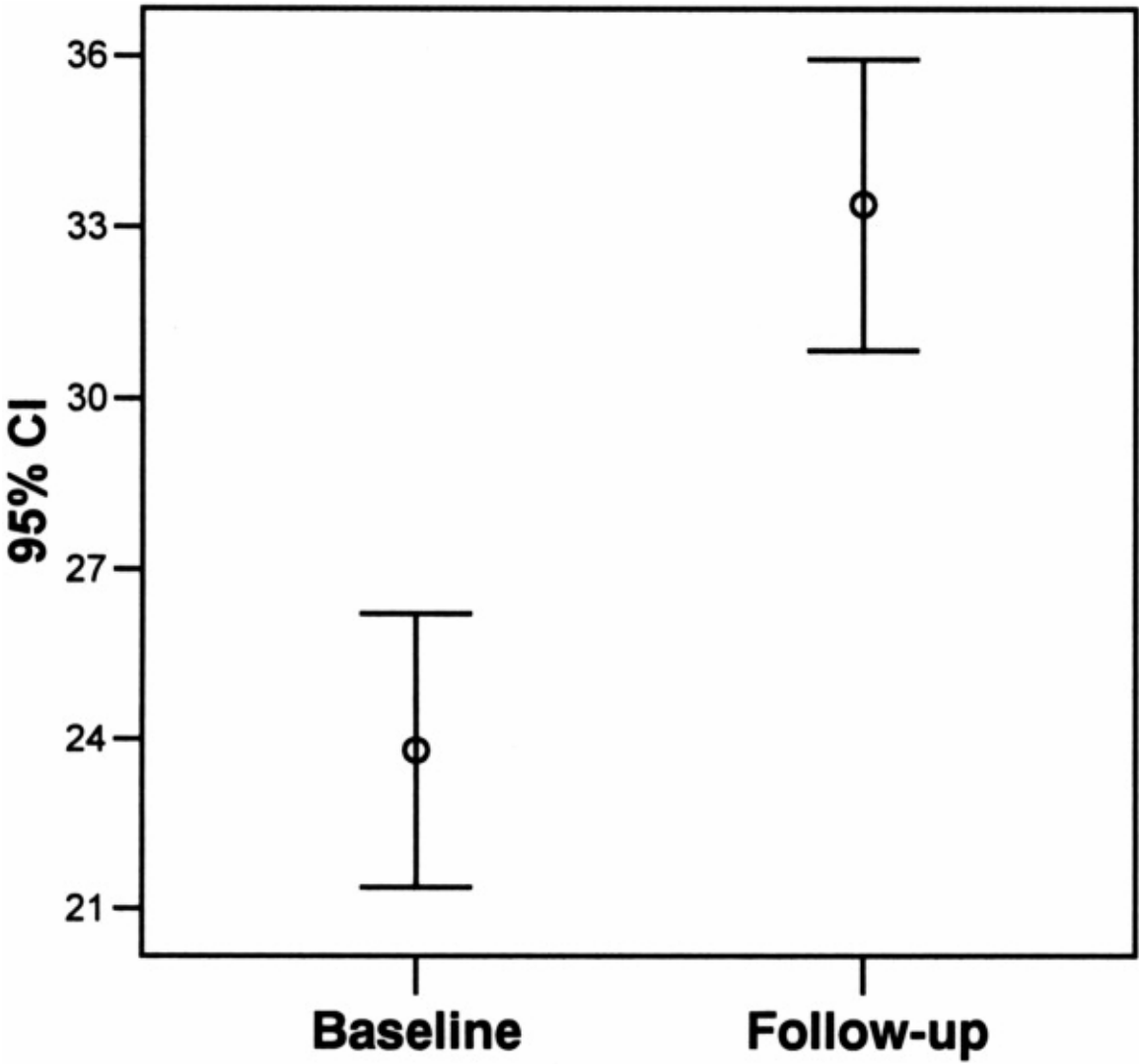
La differenza media tra basale e follow-up del punteggio UMSARS I era di 6.7 punti, corrispondente ad un aumento del 35.6% rispetto al basale. La figura 11 mostra la mancanza di sovrapposizione tra i punteggi UMSARS I basale e al follow-up dopo 12 mesi ($p<0.0001$).

Figura 11:



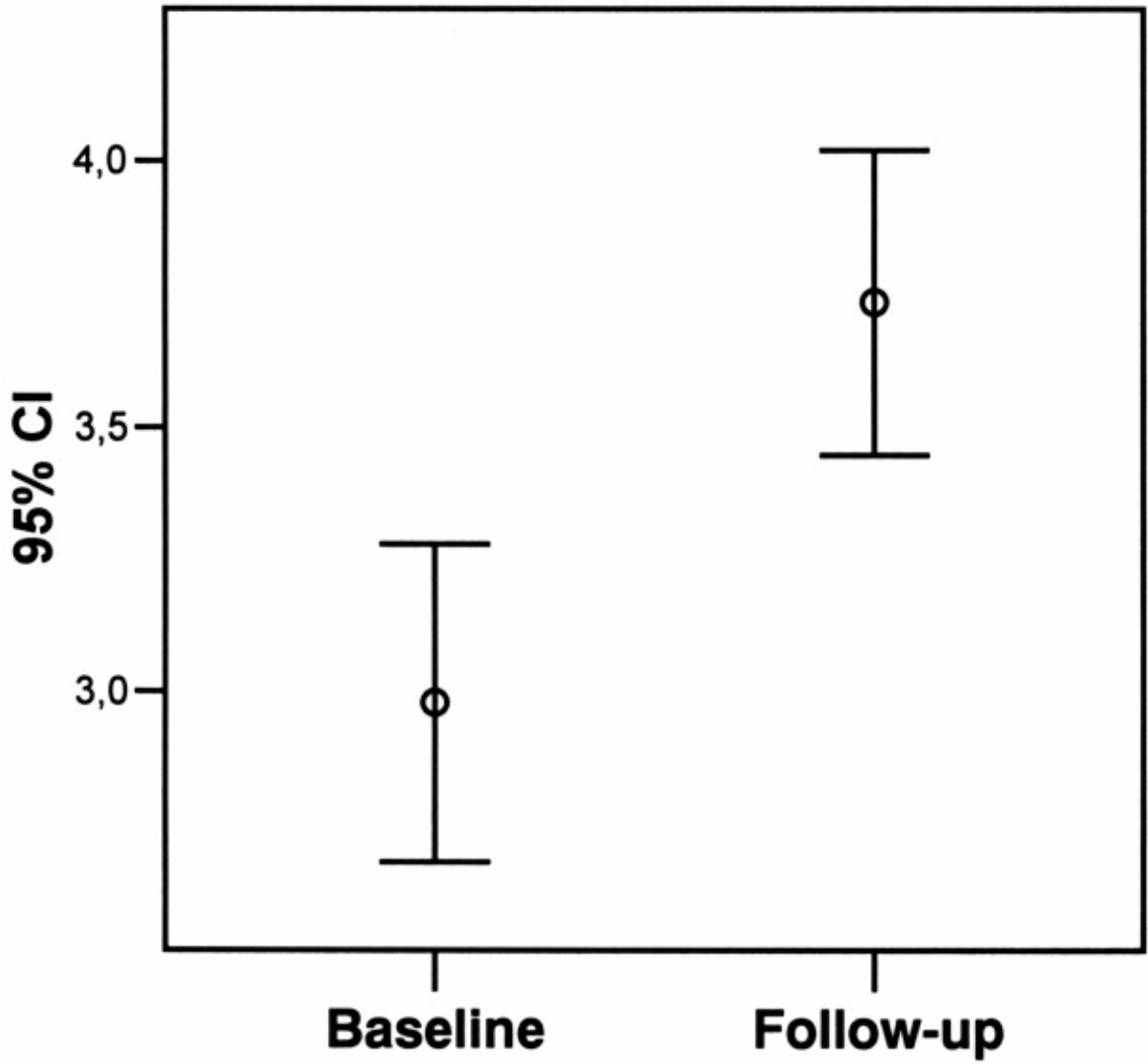
La differenza media tra basale e follow-up del punteggio UMSARS II era di 9.6 punti, corrispondente ad un aumento del 57.3% rispetto al basale. La figura 12 mostra la mancanza di sovrapposizione tra i punteggi UMSARS II basale e al follow-up dopo 12 mesi ($p<0.0001$).

Figura 12:



La differenza media tra basale e follow-up del punteggio UMSARS IV era di 0.8 punti, corrispondente ad un aumento del 33.3% rispetto al basale. La figura 13 mostra la mancanza di sovrapposizione tra i punteggi UMSARS IV basale e al follow-up dopo 12 mesi ($p<0.0001$).

Figura 13:



Gli aumenti relativi dell'UMSARS I, dell'UMSARS II e dell'UMSARS IV correlavano significativamente con le misure globali di disabilità (HY, SE ADL, SS3) (vedi Tabella 11).

Tabella 11:

Analisi della correlazione tra le variazioni dei punteggi UMSARS e le variazioni dei punteggi delle scale che misurano la severità della malattia						
	Variaz. HY		Variaz. SE ADL		Variaz. SS3	
	r^a	P	r^a	P	r^a	P
Variaz. UMSARS I	0.440	<0.01	-0.420	<0.01	0.334	<0.05
Variaz. UMSARS II	0.485	<0.001	-0.400	<0.01	0.444	<0.001
Variaz. UMSARS IV	0.476	<0.001	-0.410	<0.01	0.527	<0.001

^a coefficienti di correlazione di Spearman

Fattori predittivi di progressione

Non sono state osservate differenze nella progressione dell'UMSARS I in relazione ai sottotipi motori, alle categorie diagnostiche e al sesso. I pazienti senza segni piramidali avevano un peggioramento significativamente maggiore dell'UMSARS I (media 51,8%, IC 28.4%-75.2%) rispetto ai pazienti con segni piramidali (media 21.8%, IC 13.6%-30%; $P = 0.040$). I parametri basali che correlavano significativamente con il deterioramento dell'UMSARS I erano la durata di malattia ($r = -0.535$; $P < 0.0001$) e l'UMSARS I ($r = 0.444$; $P = 0.001$).

Il deterioramento dell'UMSARS II non era differente in relazione ai sottotipi motori, alle categorie diagnostiche e al sesso. I pazienti con segni cerebellari alla visita basale avevano un peggioramento dell'UMSARS II significativamente maggiore dei pazienti senza segni cerebellari. Invece, i pazienti senza segni piramidali alla visita basale presentavano un peggioramento dell'UMSARS II significativamente maggiore dei pazienti con segni piramidali (Tabella 12). I parametri basali che correlavano significativamente con la progressione motoria valutata con l'UMSARS II includevano la durata di malattia ($r = -0.334$; $P = 0.018$), l'UMSARS II ($r = -0.574$; $P < 0.0001$) come pure il punteggio della SS3 ($r = -0.324$; $P = 0.022$).

Tabella 12:

Fattore basale	Variazione media % dell'UMSARS II tra la valutazione basale e il follow-up (mediana; 95% IC) ^a	<i>P</i> ^b
<i>Sottotipi motori</i>		n.s.
MSA-P (n = 29)	48.7 (28.6; 31.6 to 65.7)	
MSA-C (n = 21)	69.2 (40.7; 16.3 to 122.1)	
<i>Categoria diagnostica</i>		n.s.
MSA possibile (n = 8)	40.9 (19.1; -3.9 to 85.8)	
MSA probabile (n = 42)	60.4 (38.4; 33.3 to 87.5)	
<i>Sesso</i>		n.s.
Maschile (n = 26)	71.6 (47.4; 29.0 to 114.1)	
Femminile (n = 24)	41.8 (29.5; 23.5 to 60.1)	
<i>Segni cerebellari</i>		0.020
Presenti (n = 39)	67.6 (47.4; 38.4 to 96.8)	
Assenti (n = 11)	20.8 (17.1; 7.3 to 34.3)	
<i>Segni piramidali</i>		0.007
Presenti (n = 27)	32.0 (25.0; 19.2 to 44.8)	
Assenti (n = 23)	86.9 (56.5; 39.3 to 134.6)	

^a Relativa ai punteggi basali^b Test U di Mann-Whitney

5.4 Discussione

A differenza della MP, per la quale la progressione dell'UPDRS è stata studiata in pazienti trattati e non trattati in parecchi studi clinici prospettici, ci sono solo pochi dati sulla progressione dell'MSA (24). Questo studio ha cercato di colmare questa lacuna usando diversi metodi di misura. Inoltre questo studio ha dimostrato la sensibilità al cambiamento nel tempo della scala UMSARS, una nuova scala che è stata sviluppata per misurare la severità e la progressione del danno funzionale nell'MSA (23).

Sono stati seguiti prospetticamente per un anno 50 pazienti con diagnosi di MSA possibile (16%) o probabile (84%) secondo i criteri del Consensus (6). Il 58% di essi presentava la variante

parkinsoniana dell'MSA (MSA-P), e il rimanente 42% presentava la variante cerebellare dell'MSA (MSA-C). Questa prevalenza di MSA-P è in accordo con precedenti studi.

Il breve periodo di osservazione di 12 mesi è stato sufficiente a dimostrare un significativo aumento dell'UMSARS I (35.6% rispetto al basale). L'UMSARS I correla moderatamente con la progressione globale di malattia misurata con la stadiazione HY, la scala SE ADL, e la stadiazione SS3, suggerendo che l'UMSARS I sia un valido strumento per individuare le variazioni dello stato funzionale motorio e vegetativo. L'associazione inversa osservata tra durata di malattia e variazione dell'UMSARS I e tra UMSARS I basale e variazione dell'UMSARS I suggerisce che il deterioramento funzionale sia più rapido nelle fasi iniziali di malattia piuttosto che nelle fasi più avanzate.

Abbiamo osservato un significativo aumento dell'UMSARS II (57.3% rispetto al basale). Il tasso di progressione annuale dell'UMSARS II del 60% circa osservato in questo studio sarebbe almeno tre volte maggiore di quello pubblicato per l'UPDRS nella MP (25-26). Questi dati di progressione concordano con quelli di uno studio retrospettivo clinicopatologico su 81 pazienti con varie forme di parkinsonismo atipico, che mostrava una più rapida progressione nell'MSA (27).

L'UMSARS II correla significativamente con la progressione globale di malattia misurata con la stadiazione HY, la scala SE ADL, e la stadiazione SS3, suggerendo che l'UMSARS II sia un valido strumento per misurare in maniera sensibile il peggioramento della disabilità motoria.

Il breve periodo di osservazione di 12 mesi è stato sufficiente a dimostrare un significativo aumento dell'UMSARS IV (33.3% rispetto al basale). L'UMSARS IV correla significativamente con la progressione globale di malattia misurata con la stadiazione HY, la scala SE ADL, e la stadiazione SS3, suggerendo che l'UMSARS IV sia un valido strumento per misurare la severità globale di malattia.

In questo studio non si osserva differenza di progressione tra i pazienti con MSA-P e quelli con MSA-C e tra i sessi. Tuttavia, si osserva che la presenza di segni cerebellari e l'assenza di segni piramidali alla visita basale sono correlati ad una più rapida progressione della disabilità motoria,

misurata con l'UMSARS II. Questo indica probabilmente che la progressione di malattia non è uniforme ma dipende dalla presenza o assenza di alcune caratteristiche fondamentali.

Questo studio per la prima volta mostra la rapida progressione del deterioramento motorio, delle attività di vita quotidiana e della disabilità globale nell'MSA usando la scala UMSARS e conferma la natura rapidamente progressiva dell'MSA, indipendentemente dal sesso, dal sottotipo motorio e dalla categoria diagnostica, particolarmente in pazienti con malattia iniziale e disabilità lieve alla visita basale. La correlazione tra la variazione dell'UMSARS e la variazione delle altre scale di valutazione utilizzate (HY, SE ADL e SS3) suggerisce che l'UMSARS sia uno strumento utile e sensibile per determinare il deterioramento funzionale nel tempo e per effettuare in futuro studi neuroprotettivi nell'MSA.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Wenning GK, Colosimo C, Geser F, Poewe W. Multiple system atrophy. *Lancet Neurol* 2004;93-103.
2. Bower J, Maraganore D, McDonnell S, Rocca W. Incidence of progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy in Olmsted County, Minnesota, 1976 to 1990. *Neurology* 1997;49:1284-1288.
3. Schrag A, Ben-Shlomo Y, Quinn NP. Prevalence of progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy: a cross-sectional study. *Lancet* 1999;354:1771-1775.
4. Tison F, Yekheh F, Chrysostome V, Sourgen C. Prevalence of multiple system atrophy. *Lancet* 2000;355:495-496.
5. Quinn N. Multiple system atrophy: the nature of the beast. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1989; 52:78-89.
6. Gilman S, Low P, Quinn N, et al. Consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy. *Clin Auton Res* 1998;8:359-362.
7. Osaki, Y, Ben-Shlomo Y, Wenning GK et al. Do published criteria improve clinical diagnostic accuracy in multiple system atrophy? *Neurology* 2002;59:1486-1491.
8. Colosimo C, Albanese A, Hughes AJ, De Bruin V, Lees A. Some specific features differentiate MSA from IPD. *Archives of Neurology* 1995;52:294-298.
9. Kimber JR, Watson L, Mathias CG. Distinction of idiopathic Parkinson's disease from multiple system atrophy by stimulation of growth-hormone release with clonidine. *Lancet* 1997;349:1877-1881.
10. Clarke CR, Ray PS, Speller JM. Failure of the clonidine growth-hormone stimulation test to differentiate multiple system atrophy from early or advanced idiopathic Parkinson's disease. *Lancet* 1999;353:1329-1330.

11. Tranchant C, Guiraud-Chaumeil C, Echaniz-Laguna A, Warter JM. Is clonidine growth hormone stimulation a good test to differentiate multiple system atrophy from idiopathic Parkinson's disease? *J Neurol* 2000;415:853-856.
12. Muller EE, Locatelli V, Cocchi D. Neuroendocrine control of growth hormone secretion. *Physiol Rev* 1999;79:511-607.
13. Benarroch EE, Smithson IL, Low PA, Parisi JE. Depletion of catecholaminergic neurons of the rostral ventrolateral medulla in multiple system atrophy with autonomic failure. *Ann Neurol* 1997;43:156-163.
14. Casanueva FF, Villaneuva L, Cabranes JA et al. Cholinergic mediation of growth hormone secretion elicited by arginine, clonidine and physical exercise in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1984;59:526-530.
15. Tago H, McGeer PL, Bruce G, Hersh LB. Distribution of choline acetyltransferase-containing neurons of the hypothalamus. *Brain Res* 1987;415:49-62.
16. Caffè AR. Architecture of the mammalian pituitary cholinergic system with observations on a putative blood acetylcholine sensor. *Histol Histopathol* 1996;11:537-551.
17. Spokes EGS, Bannister R, Oppenheimer DR. Multiple system atrophy with autonomic failure. *J Neurol Sci* 1979;
18. Norbiato G, Bevilacqua M, Righini V et al. Altered vasopressin response to metoclopramide in multiple system atrophy: evidence of a cholinergic defect in the hypothalamus. *Acta Neurol* 1992;85:299-301.
19. Benarroch EE, Schmeichel AM, Parisi JE. Depletion of mesopontine cholinergic and sparing of raphe neurons in multiple system atrophy. *Neurology* 2002;59:944-946.
20. Schrag A, Kingsley D, Phatouros C, et al. Clinical usefulness of magnetic resonance imaging in multiple system atrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998;65:65-71.
21. Schocke MFH, Seppi K, Esterhammer R, et al. Diffusion-weighted MRI differentiates the Parkinson variant of multiple system atrophy from PD. *Neurology* 2002;58:575-580.

22. Pierpaoli C, Jezzard P, Basser PJ, Barnett A, Di Chiro G. Diffusion tensor MR imaging of the human brain. *Radiology* 1996;201:637-648.
23. Wenning GK, Tison F, Seppi K, et al. Development and validation of the Unified Multiple System Atrophy Rating Scale (UMSARS). *Mov Disord* 2004;19:1391-1402.
24. Wenning GK, Ben-shlomo Y, Magalhaes M, Daniel SE, Quinn NP. Clinical features and natural history of multiple system atrophy. An analysis of 100 cases. *Brain* 1994;117:835-845.
25. Jankovic J, Kapadia AS. Functional decline in Parkinson's disease. *Arch Neurol* 2001;58:1611-1615.
26. Louis E, tang MX, Cole L, et al. Progression of parkinsonian signs in Parkinson's disease. *Arch Neurol* 1999;56:334-337.
27. Muller J, Wenning GK, Jellinger K, et al. Progression of Hoehn & Yahr stages in parkinsonian disorders: a clinicopathologic study. *Neurology* 2000;55:888-891.